

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pangan Universitas Muhammadiyah Malang, di UPT Materia Medica Batu, dan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – September 2020.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak simplisia antara lain spatula, timbangan analitik tipe *Ohaus Pioneer PA413*, *cabinet dryer*, *rotary evaporator* tipe IKA RV 10, erlenmeyer, *beaker glass*, kertas saring Whatman no.41, *vacuum pump* tipe *vacuubrand ME 2C*, *vacuum filter flask*, corong *buchner*, botol kaca gelap, *showcase* (polytron), *aluminium foil*, pisau, loyang, corong, gelas ukur, termometer, *hot plate* (maspion), tiang statis, dan lemari asam.

Alat-alat yang digunakan dalam proses analisa antara lain krus porselen, timbangan analitik tipe *Ohaus Pioneer PA413*, desikator tipe *Glaswerk Wertheim 6132*, *sentrifuge* tipe *caliesys PLC series*, *beaker glass*, erlenmeyer, labu takar, spatula, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, pipet ukur, pipet *filler*, mikropipet 1000 μL , tip mikropipet, oven (WTCV Binder tipe E53 – 898749), oven (romand tipe 50), kuvet, spektrofotometer UV–Vis (shimadzu), dan pH meter (eutech).

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman pepaya gantung yang diperoleh dari Kecamatan Pakisaji, Kabupaten Malang, Provinsi Jawa Timur. Pengambilan dilakukan berdasarkan bagian tanaman yaitu akar, pelepah, bunga, daun tua, dan daun muda.



Gambar 10. Bagian - bagian Tanaman Pepaya Gantung

Bahan-bahan yang digunakan untuk proses analisis kimia antara lain aquades, etanol 70 %, etanol 96 %, kuarsetin, AlCl_3 10 %, natrium asetat 1 mol, asam galat, reagen *Folin-Ciocalteu*, Na_2CO_3 7,5 %, asam askorbat, larutan asam oksalat 1 %, KH_2PO_4 , NaOH , larutan $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 %, larutan FeCl_3 0,1 %, dan larutan TCA (*Trichloroacetic Acid*) 10 %.

3.3. Metodologi Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara sederhana dengan faktor tunggal yaitu berupa bagian tanaman pepaya gantung, antara lain :

1. Akar
2. Pelepah
3. Bunga
4. Daun tua
5. Daun muda

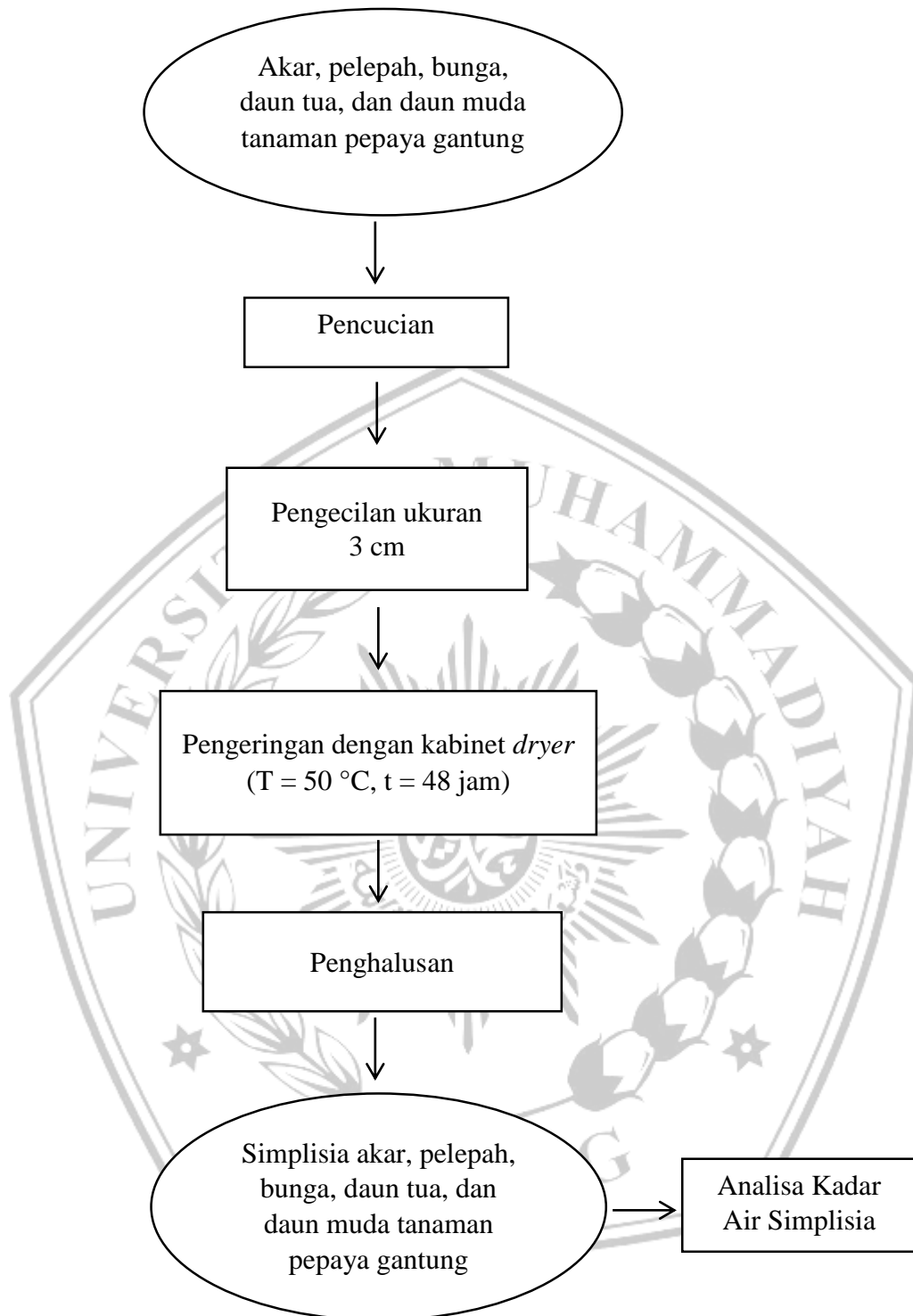
Perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan sehingga total sampel yang dianalisa sebanyak 15 sampel.

3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan simplisia bagian-bagian tanaman pepaya gantung (akar, pelepah, bunga, daun tua, dan daun muda) kemudian dilakukan analisis kadar air. Setelah itu dilanjutkan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70 %. Kemudian dilakukan analisis rendemen, total flavonoid, total fenol, dan aktivitas antioksidan metode FRAP.

3.4.1. Pembuatan Simplisia

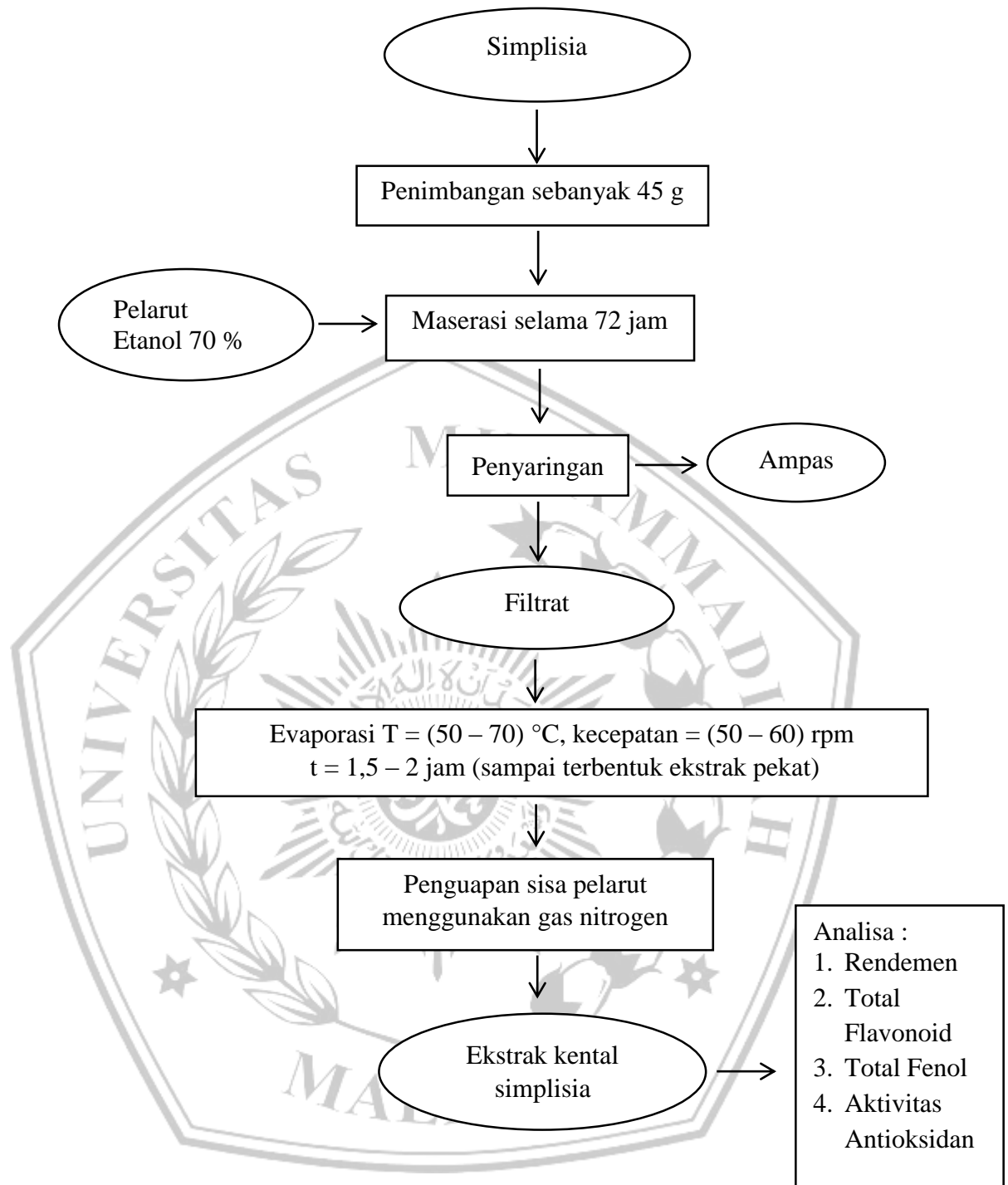
Bagian-bagian tanaman pepaya gantung (akar, pelepah, bunga, daun tua, dan daun muda) dibersihkan dari kotoran yang menempel, dicuci menggunakan air bersih, ditiriskan agar sisa air cucian tidak terikut. Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran sepanjang 3 cm. Kemudian bahan diletakkan di atas loyang dengan tebal 2 cm dan ukuran (25 x 50) cm untuk dikeringkan menggunakan kabiner *dryer* pada suhu 50 °C. Bahan yang sudah kering disortasi kembali agar terbebas dari benda asing dan kotoran yang masih menempel. Selanjutnya simplisia kering dihaluskan sehingga menjadi simplisia serbuk dan dianalisa kadar airnya (Indartiyah, dkk., 2011). Diagram alir proses pembuatan simplisia dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Diagram Alir Pembuatan Simplisia
(Indartiyah, dkk., 2011)

3.4.2. Ekstraksi Simplisia

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Proses ekstraksi dilakukan terhadap 5 sampel simplisia bagian tanaman pepaya gantung (akar, pelepah, bunga, daun tua, dan daun muda). Masing-masing simplisia ditimbang sebanyak 45 g dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Kemudian pelarut etanol 70 % ditambahkan dengan perbandingan 1:5 lalu ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan plastik *wrap*. Maserasi dilakukan selama 72 jam pada suhu ruang disertai pengadukan secara berkala. Hasil maserasi disaring untuk memisahkan filtrat dan residu menggunakan corong *buchner*. Filtrat disimpan, ampas dimaserasi kembali (remaserasi) menggunakan pelarut yang sama sebanyak 2 kali. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu (50–70) °C dengan kecepatan (50–60) rpm selama 1,5–2 jam atau sampai terbentuk ekstrak yang pekat, kemudian dikeringkan dengan gas nitrogen sehingga didapatkan ekstrak kental (Indrawari, 2010). Diagram alir proses pembuatan ekstrak simplisia dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram Alir Proses Pembuatan Ekstrak Simplisia
(Indrawari, 2010).

3.5. Prosedur Analisis

3.5.1. Analisa Kadar Air Metode Oven (Andarwulan, dkk., 2011)

1. Botol vial ditimbang dan dimasukkan ke dalam oven selama 24 jam dengan suhu (100 – 105) °C.
2. Botol vial didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
3. Botol vial ditimbang untuk mendapatkan berat botol (a).
4. Sampel ditimbang sebanyak 2 g dalam botol vial (b).
5. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu (100 – 105) °C selama 6 jam.
6. Sampel didinginkan di dalam desikator selama 15 menit.
7. Sampel ditimbang sebagai bobot akhir sampel (c).
8. Kadar air dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{berat awal (b)} - \text{berat akhir (c)}}{\text{berat awal (b)} - \text{berat botol (a)}} \times 100 \%$$

3.5.2. Analisa Rendemen (Distantina, 2010)

1. Sampel serbuk yang akan diekstrak ditimbang (B1).
2. Proses maserasi dilakukan dengan penambahan pelarut yang sudah ditentukan (1 : 5).
3. Pelarut dipisahkan dengan ampas serbuk.
4. Pelarut dengan senyawa yang telah diekstrak diuapkan.
5. Berat akhir ekstrak yang telah berbentuk pasta ditimbang (B2).
6. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100 \%$$

3.5.3. Analisa Kandungan Total Flavonoid (Chang, dkk., 2002)

3.5.3.1. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

1. Kuersetin ditimbang sebanyak 0,003 g.
2. Pelarut etanol 96 % ditambahkan sebanyak 30 mL sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm.
3. Larutan induk kuersetin dipipet ke dalam tabung reaksi 0,0 (blanko), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mL dengan ditambahkan etanol 96 % sampai total volume masing-masing 10 mL.
4. Larutan standar yang sudah ditambahkan etanol 96 % dipipet ke dalam tabung reaksi yang sudah ditutup *aluminium foil* sebanyak 0,5 mL.
5. Larutan AlCl_3 10 % ditambahkan sebanyak 0,1 mL, kemudian larutan natrium asetat 1 M sebanyak 0,1 mL, dan aquades sebanyak 2,8 mL.
6. Larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit.
7. Serapan sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.
8. Kurva standar dibuat dengan menghubungkan absorban dan konsentrasi kuersetin dan didapatkan persamaan $y = ax \pm b$.

3.5.3.2. Pengujian Kadar Total Flavonoid

1. Sampel ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol 96 % sehingga diperoleh konsentrasi 5000 ppm.
2. Larutan diambil sebanyak 1 mL dari ekstrak yang telah dibuat kemudian ditambahkan larutan AlCl_3 10 % sebanyak 0,1 mL, natrium asetat 1 M sebanyak 0,1 mL, dan aquades sebanyak 2,8 mL.
3. Larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit.

4. Serapan sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV–Vis pada panjang gelombang maksimal.
5. Kadar total flavonoid diukur dengan persamaan berikut :

$$\text{Total flavonoid} = \frac{x * FP * \text{volume kuvet (mL)}}{\text{berat bahan (mg)}}$$

x = konsentrasi ekuivalen dari grafik

FP = faktor pengenceran

3.5.4. Analisis Kandungan Total Fenol Metode Folin–Ciocalteu (Orak, 2007)

3.5.4.1. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

1. Asam galat ditimbang sebanyak 50 mg.
2. Pelarut etanol 96 % ditambahkan sebanyak 1 mL.
3. Aquades ditambahkan sampai mencapai volume akhir 50 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg.mL⁻¹.
4. Larutan induk asam galat konsentrasi 1 mg/mL dipipet 0,0 (blanko); 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,75 mL, kemudian diencerkan dengan menggunakan etanol 96 % sampai volume akhir 10 mL.
5. Masing – masing konsentrasi larutan asam galat dipipet sebanyak 0,2 mL.
6. Larutan reagen *Folin–Ciocalteu* ditambahkan sebanyak 1 mL.
7. Larutan Na₂CO₃ 10 % ditambahkan sebanyak 3 mL.
8. Larutan didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruang.
9. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
10. Serapan sampel diukur dengan spektrofotometer UV–Vis pada panjang gelombang $\lambda = 765$ nm.
11. Kurva standar dibuat dengan menghubungkan absorban dan konsentrasi asam galat dan didapatkan persamaan $y = ax \pm b$.

3.5.4.2. Pengujian Kadar Total Fenol

1. Sampel ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol 96 % sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm.
2. Larutan diambil sebanyak 7,5 mL dengan konsentrasi 2000 ppm dan diencerkan dengan etanol 96 % sampai 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1500 ppm.
3. Ekstrak diambil sebanyak 500 mL kemudian ditambahkan larutan reagen Folin–Ciocalteu sebanyak 1,5 mL, lalu dihomogenkan.
4. Kemudian larutan Na_2CO_3 7,5 % sebanyak 3 mL ditambahkan dalam campuran.
5. Larutan didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruang.
6. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
7. Serapan sampel diukur dengan spektrofotometer UV – VIS pada panjang gelombang 765 nm.
8. Kadar fenol total dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Total fenol} = \frac{x * \text{FP} * \text{volume kuvet (mL)}}{\text{berat bahan (mg)}}$$

Keterangan :

x = konsentrasi ekivalen dari grafik

FP = faktor pengenceran

3.5.5. Analisis Aktivitas Antioksidan Metode FRAP (Maryam, dkk., 2016)

3.5.5.1. Pembuatan Kurva Standar Asam Askorbat

1. Asam askorbat ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL asam oksalat 1 % sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

2. Larutan induk asam askorbat dipipet ke dalam tabung reaksi 0,0 (blanko); 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 1,1; 1,2 mL dengan ditambahkan larutan asam oksalat 1 % sampai total volume masing-masing 10 mL.
3. Larutan diambil sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi.
4. Larutan dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) ditambahkan sebanyak 1 mL.
5. Larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1 % ditambahkan sebanyak 1 mL.
6. Sampel diinkubasi pada suhu 50 °C selama 20 menit.
7. Kemudian sampel ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
8. Lapisan teratas hasil sentrifugasi dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL aquades dan larutan $FeCl_3$ 0,1 % sebanyak 0,5 mL.
9. Larutan didiamkan selama 10 menit dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

3.5.5.2. Pengujian Aktivitas Antioksidan Metode FRAP

1. Sampel ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol 96 % sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.
2. Larutan diambil sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1000 ppm dan diencerkan dengan etanol 96 % sampai 10 mL dan diperoleh konsentrasi 300 ppm.
3. Larutan diambil sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi.
4. Larutan dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) ditambahkan sebanyak 1 mL.
5. Larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1 % ditambahkan sebanyak 1 mL.
6. Sampel diinkubasi pada suhu 50 °C selama 20 menit.

7. Kemudian sampel ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
8. Lapisan teratas hasil sentrifugasi dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL aquades dan larutan FeCl_3 0,1 % sebanyak 0,5 mL.
9. Larutan didiamkan selama 10 menit dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

